



DFW

HEREBY CERTIFY THAT THIS CORRESPONDENCE IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES POSTAL SERVICE WITH SUFFICIENT POSTAGE AS FIRST CLASS MAIL IN AN ENVELOPE ADDRESSED TO: COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313-1450 BY: LYNELLE K. BUSH Lynelle K. Bush DATE: June 14, 2007

MAIL STOP: ISSUE FEE

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: **Uwe B. Sleytr et al** :
Serial No.: 10/722,962 : Group Art Unit: 1657
Filed: November 26, 2003 : Examiner: David M. Naff
For: Method of Depositing S-Layer Proteins :
on a Carrier to Immobilize Functional : Attorney Docket No.: MAT-0004
Molecules

Commissioner of Patents and Trademarks

Sir:

FURTHER REPLY TO NOTICE OF ALLOWABILITY

Applicant herewith encloses the certified copy of the Austrian priority application. It is believed that under the Treaty, there is no requirement that a certified copy of the PCT application priority document be provided.

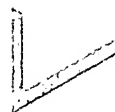
Respectfully Submitted,

Uwe B. Sleytr et al

June 14, 2007
Date

Anton P. Ness
By: Anton P. Ness
Reg. No. 28,453
Fox Rothschild LLP
1250 S. Broad Street
P.O. Box 431
Lansdale, PA 19446-0431
Telephone: 215-661-9474
Facsimile: 215-699-0231
E-Mail: aness@foxrothschild.com
Customer No. 33941

Zentrale Dienste
Verwaltungsstellendirektion



Dresdner Straße 87
1200 Wien
Austria

www.patentamt.at

Kanzleigebür € 25,00
Schriftengebühr € 91,00

Aktenzeichen A 843/2001

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

o.Univ.Porf. Dipl.-Ing. Dr. Uwe⁺B. Sleytr
in A-1220 Wien, Industriestraße 137 / Parz. 14,

am 29. Mai 2001 eine Patentanmeldung betreffend

"Verfahren zum Erzeugen einer Schicht funktioneller Moleküle",

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung
samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 30. Mai 2007

Der Präsident:

i. A.



HRNCIR
Fachoberinspektor

A 843/2001

015110

Urtext

⁵¹⁾ Int. Cl. :

AT PATENTSCHRIFT

¹¹⁾ Nr.

⁷³⁾ Patentinhaber: o.Univ.Prof. Dipl.Ing. Dr. Uwe B. Sleytr
Wien (AT)

⁵⁴⁾ Gegenstand: Verfahren zum Erzeugen einer Schicht funktioneller Moleküle

⁶¹⁾ Zusatz zu Patent Nr.

⁶⁷⁾ Umwandlung aus GM

⁶²⁾ Ausscheidung aus:

²²⁾ ²¹⁾ Angemeldet am: 29. Mai 2001

³³⁾ ³²⁾ ³¹⁾ Unionspriorität:

⁴²⁾ Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

⁴⁵⁾ Ausgegeben am:

⁷²⁾ Erfinder:

⁶⁰⁾ Abhängigkeit:

⁵⁶⁾ Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

VERFAHREN ZUM ERZEUGEN EINER SCHICHT FUNKTIONELLER MOLEKÜLE

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Erzeugen einer Schicht funktioneller Moleküle auf einer Trägeroberfläche unter Verwendung von Zelloberflächenschicht-Proteinen (S-Schichten-Proteinen) als Träger der funktionellen Moleküle, bei welchem eine S-Schicht-Proteine in Form von Monomeren oder Oligomeren enthaltende Lösung mit der Trägeroberfläche in Kontakt gebracht wird, eine Lage von S-Schicht-Proteinen auf der Trägeroberfläche abgeschieden wird und in der so gebildeten Lage eine zweidimensionale kristalline Struktur ausgebildet wird.

Die Herstellung von rekristallisierten S-Schichten aus proteinhaltigen kristallinen Zelloberflächenschichten (bakterielle Zelloberflächenschichten) auf festen oder flüssigen Substraten ist beispielsweise in der EP 0 154 620 B1 (= US 4,752,395) beschrieben, die insbesondere die Herstellung von mehrlagigen S-Schichten aus Prokaryonten und deren Verwendung als Ultrafiltrationsmembranen betrifft.

S-Schichten bestehen aus Proteinen, die in Prokaryonten als Zellwandbausteine vorkommen, wobei die Aminosäuresequenz eines S-Schicht-Proteins im allgemeinen Art- oder Stammspezifisch ist; die S-Schicht-Proteine sind in der Regel einfache Proteine oder Glykoproteine. Derzeit sind mehrere hundert Bakterienstämme bekannt, deren Zelloberflächen kristalline Strukturen aufweisen. Die Gitterkonstanten dieser Strukturen liegen im Bereich von ca. 3 bis 35 nm, und die S-Schichten sind als kristalline monomolekulare Schichten zumeist 3 bis 30 nm dick.

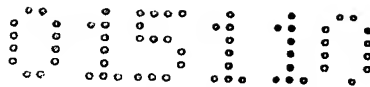
Isolierte - von der Ursprungszelle abgelöste - S-Schicht-Proteine zeigen die Fähigkeit, aus einer Lösung zu monomolekularen Kristallgittern (S-Schichten) zusammen zu treten, die den Kristallverbänden in der Zellwand einer intakten Zelle entsprechen. Generell ist eine vollständige Desintegration von S-Schichten in konzentrierten Lösungen chaotroper Agenzien sowie durch Senkung oder Erhöhung des pH-Wertes erzielbar. Bei dem Wiederezusammen-treten der S-Schicht-Proteine („Rekristallisation“) können sich flache Schichten, Röhrenstruk-turen wie z.B. Zylinder, sowie geschlossene Strukturen (Vesikel) ausbilden - sogenannte Self-Assembly-Produkte -, und zwar in Abhängigkeit von den intrinsischen Eigenschaften der S-Schicht-Proteine und den Bedingungen bei der S-Schicht-Bildung, wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke und Ionenzusammensetzung der Lösung; neben Monoschichten können sich auch mehrlagige S-Schichten ausbilden. Die Ausbildung der S-Schichten erfolgt durch Selbstorganisation ('self-assembly'), da sämtliche Information zur Ausbildung der S-Schicht-Struktur in den individuellen Monomeren enthalten ist. Die S-Schichten bilden sich

bevorzugt an Grenzschichten aus, z.B. an der Luft-Wasser-Grenze, auf Lipid-Filmen oder auf einer festen Substratoberfläche wie jene eines Silizium-Wafers, einer Elektrode oder eines synthetischen Polymers. Durch die spezifischen Oberflächeneigenschaften der S-Schicht-Proteineinheiten, wie z.B. Ladungsverteilung, Hydrophobie, spezifische Wechselwirkungen mit Komponenten der Grenzschicht, kommt es zu einer definierten Orientierung der S-Schicht-Einheiten (Monomere, Oligomere oder kleine Kristallite) beim Anlagern an die Grenzschicht und Einbau ins S-Schicht-Gitter.

S-Schichten stellen hochporöse Membranen dar, wobei die Poren als Teil des S-Schicht-Gitters einheitliche Größe und Gestalt im Bereich von ca. 2-6 nm aufweisen; die Porosität kann bis zu 70% der Fläche ausmachen. Es ist bekannt, S-Schicht-Gitter wegen der hohen Dichte sowie definierten Position und Orientierung von funktionellen Gruppen, die an der Oberfläche der S-Schicht-Einheiten angeordnet sind, zur Immobilisierung verschiedener (Makro)Moleküle zu nutzen. Um kovalente Bindungen zwischen den S-Schicht-Subeinheiten zu erzeugen und die Stabilitätseigenschaften zu verbessern, wurden S-Schicht-Gitter mit homobifunktionellen, Aminogruppen-spezifischen Vernetzern verschiedener Länge (z.B. Glutaraldehyd) quervernetzt. Viele Enzyme, die auf aktivierten Endgruppen der S-Schicht-Proteine immobilisiert wurden, bildeten eine Monoschicht dicht angeordneter Moleküle auf der äußeren Oberfläche des S-Schicht-Gitters aus. Die sehr spezifischen morphologischen und biophysikalischen Eigenschaften von S-Schicht-Proteinen, besonders ihre Fähigkeit, sich zu monomolekularen kristallinen Gittern zu organisieren, die an ihrer Oberfläche eine räumlich definierte Anordnung funktioneller Gruppen sowie von Poren gleicher Größe und Morphologie aufweisen, haben zu einem breiten Spektrum an Anwendungen in der Biotechnologie, Nanotechnologie und Biomimetik geführt.

Für nähere Details zu S-Schichten sei auf den Artikel 'Crystalline Bacterial Cell Surface Layers (S-Layers): A Versatile Self-Assembly System' von U.B. Sleytr *et al.*, Kapitel 5 aus "Supramolecular Polymers", Ed. A. Ciferri, Marcel Dekker Inc., New York 2000 (ISBN 0-8247-0252-2), verwiesen.

Eine Verwendung von S-Schichten zur Herstellung von Sensorsystemen beschreiben A. Neubauer *et al.* in Sensors and Actuators B 40 (1997) 231-236. Dieser Artikel behandelt die Abscheidung einer Goldschicht auf eine S-Schicht mittels des sogenannten PLD-Verfahrens ('pulse laser deposition', Abscheidung unter Verwendung eines gepulsten Lasers unter Hochvakuumbedingungen), wobei auf die S-Schicht zuvor Enzyme, wie z.B. Glukose-Oxidase, immobilisiert worden war. Weitere Verfahren zur Abscheidung von Metallschichten auf S-Schichten sind unter anderem von D. Pum *et al.* in Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 101 (1997) 1686-1689, und A. Neubauer *et al.* in PTB-Berichte F-34 (1998), S. 75-81 behandelt.



Letzterer Artikel diskutiert auch die elektrochemische Abscheidung einer Metallschicht (z.B. Gold) auf eine S-Schicht, allerdings mit wenig zufriedenstellendem Erfolg, da die abgeschiedene Metallschicht eine Kornstruktur aufweist, die der Struktur der darunter liegenden S-Schicht nicht korrespondiert.

Bei der Ablagerung einer S-Schicht aus einer Lösung, die S-Schicht-Proteine enthält, scheiden sich die S-Schicht-Einheiten gerichtet auf die Substratoberfläche ab. Sie liegen auf der Oberfläche zunächst ungeordnet vor, die Ausbildung der kristallinen Struktur erfolgt erst im Laufe des Abscheidenvorgangs, gewöhnlicherweise von Kristallisationskeimen ausgehend. Insbesondere wenn die Dichte der S-Schicht-Proteine auf der Substratoberfläche noch nicht sehr groß ist, können sich die einzelnen Einheiten auf der Oberfläche umher bewegen, wobei die Beweglichkeit unter anderem von der Art der Oberfläche anhängt. Der Übergang in eine geordnete Struktur erfolgt häufig spontan, wenn S-Schicht-Einheiten in ausreichender Menge auf der Substratoberfläche abgeschieden sind. Auch nach der Ausbildung einer kristallinen S-Schicht kann noch Abscheidung gelöster S-Schicht-Proteine aus der Lösung und Anlagerung an das S-Schicht-Gitter stattfinden.

Bei bekannten Abscheidungsverfahren treten auch schon in der Lösung S-Schicht-Einheiten zu S-Schichten und S-Schicht Self-Assembly Produkten undefinierter Größe zusammen, die in Lösung oder Suspension verbleiben oder sich auf das Substrat abscheiden. Dieser Vorgang steht somit in Konkurrenz zur direkten Abscheidung von S-Schicht-Einheiten auf das Substrat. Dadurch gestaltet sich die Kontrolle des Herstellungsvorgangs einer S-Schicht schwierig - im besonderen wenn zuverlässig eine Monoschicht abgeschieden werden soll. Weiters kann es beim Abscheidungsprozess von S-Schicht-Einheiten zur Ausbildung kristalliner Doppel- und Mehrfachschichten kommen. Dieser Vorgang ist für viele Anwendungsfälle sehr störend, da die zweite (aufliegende) S-Schicht zumeist spiegelverkehrt an die erste (auf der Substratoberfläche gebundene) S-Schicht gebunden ist und somit deren funktionelle S-Schicht-Domänen, die für die Anwendung benötigt werden, maskiert.

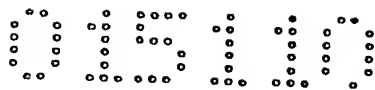
Außerdem sind die bekannten Verfahren hinsichtlich der langreichweitigen Ordnung der erzeugten S-Schicht-Strukturen verbesserungswürdig. Insbesondere enthält bei den kristallinen Strukturen, die mittels der genannten Verfahren erzeugt werden, die S-Schicht-Struktur unweigerlich eine Vielzahl von Domänen, deren Ausdehnung somit eher klein ist. Um Domänen großer Fläche zu erhalten, ist es wünschenswert die Zahl der Domänen bzw. die Zahl der Keime, an denen die Ausbildung der Kristallstruktur der S-Schicht ihren Ausgangspunkt nimmt, klein zu halten.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Bildung einer S-Schicht und die Formierung der S-Schicht-Kristallstruktur in gegenüber den bekannten Verfahren verbesserter Weise steuern zu können.

Diese Aufgabe wird von einem Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, bei welchem zum Abscheiden der S-Schicht-Proteine elektrochemische Bedingungen in der Lösung eingestellt werden, bei welchen die S-Schicht-Proteine eine elektrische Nettoladung aufweisen, und durch Einstellung des elektrischen Potentials des Substrats eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen der Lösung und der Trägeroberfläche hergestellt wird, unter deren Wirkung sich die S-Schicht-Proteine aus der Lösung auf die Trägeroberfläche anreichern und gezielt orientieren.

Nach der Erfindung wird die Ausbildung der S-Schicht auf der Substratoberfläche durch elektrochemische Manipulation des Lösung-Substrat-Systems kontrolliert. Durch zeitliche Variation der elektrochemischen Parameter und/oder durch Einstellen unterschiedlicher Bedingungen in der Lösung und auf der Substratoberfläche mittels elektrochemischer Methoden gelingt eine verbesserte Kontrolle der Ausbildung der S-Schicht, und die Auswahl eines gewünschten Prozessweges der S-Schicht-Bildung ist möglich, was beispielsweise die Herstellung von S-Schicht-Monoschichten oder Schichten mit einer gewünschten Anzahl oder Abfolge von S-Schichten deutlich erleichtert. Weiters kann eine schnellere Belegung der Substratoberfläche und Ausbildung monomolekularer, kristalliner S-Schichten insbesondere auf festen Trägern und eine zuverlässige orientierte Ablagerung der S-Schicht-Proteine erzielt werden.

Durch die erfindungsgemäßen elektrochemischen Maßnahmen gelingt die Kontrolle der elektrostatischen Aufladung und der Zusammensetzung der elektrochemischen Doppelschicht auf der Substratoberfläche (sogenannte Helmholtzschicht, Fig. 1), und zwar im besonderen der extrinsischen chemischen Zusammensetzung der äußeren Helmholtzschicht, welche aus elektrostatisch gebundenen Ionen besteht, sowie der inneren Helmholtzschicht, die durch chemisch gebundene geladene Teilchen gebildet wird. Weiters ermöglicht die Erfindung eine Migrationskontrolle der Adsorption und Desorption durch die Kontrolle des diffusen Teils der elektrochemischen Doppelschicht, der sogenannten diffusen Schicht (oberhalb der Helmholtzschicht). In diesen Schichten stellen sich direkt über der Substratoberfläche chemische Bedingungen ein, die von den chemischen Bedingungen in der Lösung verschieden sind und für die Zwecke der Abscheidung und/oder Kristallisation der S-Schicht-Proteine eingestellt werden. So können z.B. in der Schicht unmittelbar über der Substratoberfläche Feldstärken im Bereich von 10^5 V/cm auftreten. Diese Feldstärken stellen



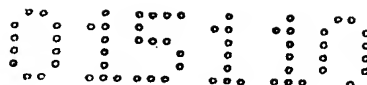
einen wesentlichen Aspekt bei der Anlagerung der S-Schicht-Proteine an die Substratoberfläche aus der Lösung dar.

Besonders nennenswerte Vorteile der Erfindung sind:

- (1) Möglichkeit der verbesserten molekularen Reinigung, Erneuerung und reproduzierbaren Formierung des Substrats noch vor der Abscheidung der S-Schicht, da dies ebenfalls mit elektrochemischen Methoden *in situ* durchgeführt werden kann;
- (2) Erreichbarkeit einer hohen Oberflächenkonzentration von S-Schicht-Subeinheiten (Monomeren), S-Schicht-Oligomeren oder -Kristalliten (z.B. als Nukleationskeime), wobei vor der Ausbildung der Kristallstruktur auch ein Konzentrationsüberschuss ('Surface Excess') erreichbar ist;
- (3) verbesserte molekulare Orientierung, z.B. hinsichtlich der Außen- und Innenseite der S-Schicht-Subeinheiten und der Nukleationskeime;
- (4) kontrollierte Durchführbarkeit einer Protonierung der S-Schicht-Subeinheiten und/oder der Substratoberfläche, wodurch die Natur der Bindung an die Substratoberfläche (Fixierung) bestimmbar ist;
- (5) Durchführbarkeit einer Koadsorption (physikalische und/oder chemische Adsorption) von kristallisationsfördernden Substanzen, z.B. ein- oder zweiwertigen Ionen, aus der Lösung oder aus dem Substrat an die S-Schicht;
- (6) Durchführbarkeit einer Koadsorption von Reaktanden, z.B. Fixierungsförderern;
- (7) Durchführbarkeit einer elektrochemischen Konservierung (d.h. Strukturstabilisierung) und/oder elektrochemischen Modifikation der S-Schicht-Subeinheiten oder S-Schicht-Kristalle bzw. -Nukleationskeimen;
- (8) vereinfachte Qualitätskontrolle;
- (9) Durchführbarkeit getrennter Verfahrensschritte zur Adsorption von S-Schicht-Proteinen und Rekristallisation;
- (10) Durchführbarkeit kontinuierlicher Verfahren, wobei die Substratreinigung, die Adsorption von S-Schicht-Proteinen und die Rekristallisation in getrennten Schritten, gegebenenfalls räumlich getrennt (z.B. verschiedene Gefäße), erfolgen kann.

Als Substrate kommen grundsätzlich beliebig geformte und dimensionierte kondensierte Phase in Betracht, wie z.B. Platten, poröse Körper oder disperse Phasen (z.B. Suspensionen).

Durch elektrochemische Kontrolle der Substratoberfläche können beim Ausbilden des Kristallgitters Bedingungen eingestellt werden, die optimal für die Kristallisation der gebundenen S-Schicht-Subeinheiten sind. Angestrebt werden insbesondere Bedingungen, unter denen sich die gebundenen S-Schicht-Subeinheiten möglichst ungehindert, insbesondere durch laterale Diffusion, zu großflächigen, kristallinen S-Schicht-Domänen umordnen



können. Da S-Schicht-Proteingitter auf der Außen- und Innenseite zumeist eine unterschiedliche Nettoladung aufweisen, erfolgt auch die Bindung von S-Schicht-Proteinen auf geladenen Oberflächen in streng definierter Orientierung. Somit kann durch eine kontrollierte Einstellung der Oberflächenladung eines festen Trägers eine gerichtete Adsorption von gelösten S-Schicht-Proteinen (und Nukleationskeimen, d.h. S-Schicht-Kristalliten) erreicht werden. Da die Oberflächenladung von S-Schicht-Proteinen zudem vom pH-Wert der Proteinlösung abhängt, ist der Adsorptionsvorgang (Orientierung der S-Schicht-Proteine bei der Adsorption) sowie die Stärke der Bindung der S-Schicht-Proteine an der Oberfläche des festen Trägers durch Variation der Milieubedingungen beeinflussbar und optimierbar. Eine ladungsabhängige Adsorption und Kristallisation von S-Schicht-Proteinen kann auch zu einer gezielten Abscheidung an strukturierten Oberflächen (z.B. Halbleitermaterialien, Leiterplatten, leitfähigen Polymeren, kompositen Materialien) genutzt werden.

Die Erfindung gestattet zudem die Ausbildung mehrerer S-Schichten auf die Substratoberfläche in definierter Reihenfolge durch entsprechende Wiederholung der jeweils zur Abscheidung/Kristallisation erforderlichen Bedingungen.

In einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung erfolgen das Abscheiden der S-Schicht-Proteine und das Ausbilden der kristallinen Struktur in der abgeschiedenen Proteinschicht voneinander zeitlich getrennt und unter verschiedenen elektrochemischen Bedingungen der Lösung und/oder des Substrats. In diesem Fall liegen die S-Schicht-Subeinheiten zwischen dem Abscheiden und der Kristallisation ungeordnet auf der Substratoberfläche vor und können auf dieser lateral wandern. Die optimalen Milieubedingungen für die Adsorption von S-Schicht-Monomeren/Oligomeren einerseits und für die Kristallisation der an der Oberfläche gebundenen Proteine andererseits sind im allgemeinen verschieden; sie können in zeitlicher Abfolge eingestellt werden, beispielsweise durch kontinuierliche Veränderung der betreffenden Parameter.

Hierbei kann die Änderung der elektrochemischen Bedingungen vorteilhafterweise darin bestehen, dass zwischen Abscheiden und Kristallisation das elektrochemische Potenzial der Trägeroberfläche gegenüber der Lösung geändert wird. Außerdem kann zur Änderung der elektrochemischen Bedingungen zwischen Abscheiden und Kristallisation zumindest ein chemischer Parameter der Lösung variiert werden. Als chemische Parameter kommen im besonderen die Konzentration bzw. Ionenstärke des Leitelektrolyts, der pH-Wert, die Sauerstoff-Konzentration oder allgemeiner das Potenzial für Elektronentransfer-Reaktionen sowie die Ionenkonzentration bzw. Konzentration gelöster Stoffe in Frage. Darüber hinaus kann der Prozess auch über die Konzentration anderer Ionen der Lösung oder die Temperatur beeinflusst werden. Ebenso kann zur Änderung der elektrochemischen Bedingungen,

anstelle oder in Kombination zu den vorgenannten Parametern, zwischen Abscheiden und Kristallisation zumindest ein elektrochemischer Parameter des Substrats variiert werden, z.B. dessen Ladung, die Bedeckung mit Ionen (beispielsweise Hydroxyl-Ionen) oder chemische Modifikation (Morphologie auf mesoskopischer und/oder atomarer Dimension, wie Rauheit).

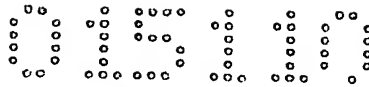
Die elektrische Nettoladung der S-Schicht-Proteine kann auf besonders einfache Weise durch Einstellen des pH-Werts der Lösung bestimmt werden.

In einer weiteren vorteilhaften Variante der Erfindung wird die elektrische Nettoladung der S-Schicht-Proteine diesen elektrostatisch oder elektrophoretisch aufgeprägt. Beispielsweise können durch Veränderung der Oberflächenladung des Trägers nach der Proteinadsorption optimale Bedingungen für die Kristallisation eingestellt werden. Zudem ist es möglich, nach der Ausbildung kristalliner S-Schichten durch die Anlegung von Spannungen an Oberflächen auch weitere geladene Moleküle oder Metall-Cluster an der Oberfläche der S-Schicht-Gitter oder in den Poren zu binden.

Darüber hinaus ist es günstig, wenn bei dem Abscheiden der S-Schicht-Proteine und/oder dem Ausbilden der kristallinen Struktur eine Konformationsänderung der Proteine eintritt, insbesondere eine Denaturierung bzw. Renaturierung. Dies erleichtert zusätzlich die Steuerung der Ausbildung der S-Schicht.

Das Abscheiden der S-Schicht-Proteine und/oder das Ausbilden der kristallinen Struktur kann durch einen zeitlich variierten Potential/Stromverlauf, z.B. Pulse oder Rampen, gesteuert werden.

Die Protein-Adsorption und -Kristallisation können auch in verschiedenen Gefäßen oder Gefäßkompartimenten unter den jeweils für die Prozessschritte einstellbaren Bedingungen stattfinden, wobei in den Gefäßen verschiedene Lösungen enthalten sind, die sich z.B. hinsichtlich der gelösten Substanzen unter Beibehaltung der Leitsubstanz und/oder des Lösungsmittels unterscheiden; auch kann dies in einem Gefäß erfolgen, z.B. durch einen kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Wechsel der verwendeten Lösung, wie Ablassen der ersten und Einfüllen einer zweiten Lösung. Dem gemäß wird das Abscheiden der S-Schicht-Proteine auf das Substrat in einer ersten Lösung und das Ausbilden der kristallinen Struktur in einer zweiten Lösung durchgeführt. Hierbei ist es günstig, wenn dem Substrat vor dem Eintauchen in die erste Lösung eine Nettoladung elektrostatisch oder elektrophoretisch aufgeprägt wird, welche bei dem Durchgang durch die Lösungen erhalten bleibt; ebenso kann dem Substrat in der ersten Lösung elektrochemisch eine Nettoladung



aufgeprägt werden, welche bei dem Wechsel der Lösungen erhalten bleibt. Zusätzlich kann der Wechsel der Lösungen durch Transport der Trägeroberfläche von einem ersten Lösungsbad, in dem das Abscheiden erfolgt, zu einem zweiten Bad für die Kristallisation geschehen (sogenannte Emersion). Dies entspricht einem Batch-Verfahren. In einer Variante hierzu kann der Transport in einem kontinuierlichen Transportprozess erfolgen, in dem das - z.B. band- oder faserförmige - Substrat nach Art eines Fließband hintereinander durch verschiedene Bäder hindurchgeführt wird, wobei sich zur gleichen Zeit verschiedene Teile desselben Substrats in jeweils einem anderen Bad befinden können.

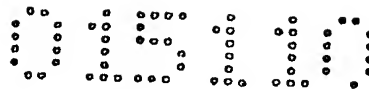
Die Immobilisierung der funktionellen Moleküle an der S-Schicht kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass funktionelle Moleküle an S-Schicht-Proteine noch vor der Abscheidung der S-Schicht-Proteine gebunden werden und sodann die funktionellen Moleküle auf das Substrat zugleich mit dem Abscheiden der S-Schicht-Proteine abgelagert werden. Hierbei ist es zweckmäßig, wenn die funktionellen Moleküle ausschließlich oder zumindest zu einem großen Teil auf einer Seite der S-Schicht-Proteine - z.B. auf jener Seite, die der Innenseite der Zellwand entspricht - gebunden werden und für das Abscheiden elektrochemische Bedingungen gewählt werden, unter denen die S-Schicht-Proteine ein resultierendes Dipolmoment aufweisen, wobei aufgrund der Ausrichtung des Dipolmoments nahe der Trägeroberfläche im infolge der Potentialdifferenz bestehenden elektrischen Feld besagte Seite der S-Schicht-Proteine von der Trägeroberfläche abgewandt ist.

Alternativ oder in Kombination hierzu kann die Immobilisierung dadurch geschehen, dass nach der Ausbildung der kristallinen Struktur in der S-Schicht-Lage funktionelle Moleküle auf das Substrat an durch die kristalline Struktur definierte Positionen abgelagert werden.

Als funktionelle Moleküle können unter anderem Enzyme, Virusproteine oder andere Proteinfunktionen verwendet werden. Die funktionelle Einheit kann auch dadurch realisiert sein, dass das S-Schicht-Protein als rekombinantes Fusionsprotein eine oder mehrere funktionelle Einheiten aufweist.

Weiters können nach der Ausbildung der kristallinen Struktur in der S-Schicht-Lage elektrochemisch Nanopartikel auf das Substrat an durch die kristalline Struktur definierte Positionen abgelagert werden. Dies schließt auch die Verwendung der S-Schicht als Templat zur Abscheidung einer zweiten Phase ein.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand einiger nicht einschränkender Ausführungsbeispiele mit Bezug auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. In den Figuren zeigen:



- Fig. 1 ein Schema des Aufbaus der elektrochemischen Doppelschicht (nach Gouy, Chapman und Stern);
- Fig. 2 eine Vorrichtung zur Durchführung eines kontinuierlichen Beschichtungsprozesses für ein Bandsubstrat;
- Fig. 3 eine Anordnung zur elektrostatischen Aufladung des Bandsubstrats der Fig. 2;
- Fig. 4 eine Vorrichtung zur elektrophoretisch induzierten S-Schicht-Deposition, beruhend auf einer elektrochemischen Suspensionszelle nach B. Kastening *et al.*;
- Fig. 5 den Vorgang der elektrophoretisch induzierten Deposition.

Die im folgenden behandelten Beispiele beschreiben Vorgehensweisen, bei denen gemäß der Erfindung eine Schicht funktioneller Moleküle auf einer elektronisch leitenden Trägeroberfläche unter Verwendung von Monomeren, Oligomeren oder Kristalliten von proteinhaltigen Zelloberflächenschichten (S-Schicht-Proteinen) elektrochemisch abgeschieden, zur zweidimensionalen Kristallisation gebracht und schließlich elektrochemisch fixiert wird. Ein Substratmaterial, welches elektrische Ladung leiten und/oder akkumulieren kann, wird dabei derart konditioniert, dass (1) Adsorption, (2) Orientierung, (3) Oberflächendiffusion, (4) Kristallisation und (5) Fixierung von S-Schicht-Einheiten elektrochemisch kontrolliert ablaufen.

Mit Hilfe einer potentiostatischen elektrochemischen Steuerung des Substratmaterials lassen sich grundsätzlich drei elektrochemische Oberflächentypen einstellen, die den entscheidenden Einfluss auf die oben genannten Prozesse haben. Der erste Bereich ist dadurch gekennzeichnet, dass eine negative Oberflächenladung vorliegt, der zweite dadurch, dass eine positive Nettoladung eingestellt wird. Der dritte Bereich, in dem noch positivere Potentiale erzeugt werden, zeichnet sich dadurch aus, dass die Oberfläche elektrochemisch umgewandelt wird, sodass nunmehr das Substrat nur mehr über eine hydroxidische oder oxidische Oberfläche mit Adsorbaten in Wechselwirkung tritt. In den ersten beiden Bereichen wird die Wechselwirkung zu Adsorbaten überwiegend durch elektrostatische Kräfte bestimmt und erst in zweiter Linie durch chemische (z.B. van-der-Waals-Kräfte). Im dritten Bereich überwiegen dagegen chemische (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) und nicht elektrostatische Wechselwirkungen.

Beispiel 1

Das Schicht-Protein SbsB – z.B. in seiner rekombinant hergestellten Form, die als rSbsB₃₂₋₉₂₀ bezeichnet wird – weist als reifes Protein einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von

S-Schicht-Protein-Form	SbsB	SbpA	SbsC
GBAN	X 98095	AF 211170	AF 055578
reifes Protein	pI 4.95 Aminosäure 32-920	pI 4.60 Aminosäure 31-1268	pI 5.40 Aminosäure 31-1099
N-Terminus	pI 8.94 Aminosäure 32-207	pI 4.49 Aminosäure 31-202	pI 9.13 Aminosäure 31-270
Restliche Sequenz	pI 4.73 Aminosäure 208-920	pI 4.63 Aminosäure 203-1268	pI 4.88 Aminosäure 271-1099

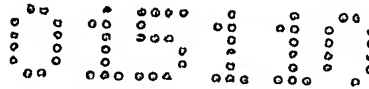
Tabelle 1: Theoretische isoelektrische Punkte (pI) der reifen S-Schicht-Proteine, der N-Termini, sowie der restlichen Sequenzen. Die Zeile GBAN gibt die GenBank-Zugriffsnummer (GenBank Accession Number) wieder.

4.95 auf. Die N-terminale Region (Aminosäuren 32-207), die drei sog. S-Layer Homologe Motive (SLH-Motive) umfasst, hat einen pI von 8.94; für den Rest der Sequenz (Aminosäuren 208-920) wurde ein pI von 4.73 errechnet (siehe Tabelle 1). Versuche mit rekombinant hergestellten, N-terminal verkürzten SbsB-Formen, denen bis zu 3 SLH-Motive fehlten, bestätigten, dass der N-Terminus nicht in den Self-Assembly Vorgang involviert ist.

Zur Herstellung von löslichem S-Schicht-Protein (S-Schicht-Monomere oder Oligomere für die Kristallisation an festen Oberflächen) wurden 0.2 mg S-Schicht Self-Assembly Produkte von rSbsB₃₂₋₉₂₀ (monomolekulare S-Schicht-Proteinkristalle mit einer Größe von 0.1 bis 5 µm) in 1 ml 5 M Guanidinhydrochlorid (GHCl) in 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gelöst, und 24 Stunden gegen Aq. purif. bei 4°C dialysiert. Aufgrund der geringen Konzentration an S-Schicht-Protein wurde die Ausbildung von Self-Assembly Produkten während der Dialyse verhindert. Gleichwohl wurde nach Beendigung der Dialyse bei 40 000 g für einen Zeitraum von 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der klare Überstand entnommen, der pH-Wert der Lösung mit 0.01 N NaOH auf 6.5 eingestellt, und 400 µl dieser Lösung zur Kristallisation verwendet.

Zunächst wurde in der Elektrolytlösung ohne S-Schicht-Protein ein Reinigungsschritt durchgeführt, in dem durch wiederholtes Zyklisieren des Elektrodenpotentials zwischen extremen Werten (z. B. an Gold zwischen -1.2 V und +0.8 V gegen eine gesättigte Quecksilbersulfatelektrode) unter Beibehaltung des pH-Werts eventuelle Kontaminatschichten durch den totalen Austausch der Oberflächenatome des Substrates eliminiert wurden.

Für die nachfolgende S-Schicht-Adsorption kann als fester Träger ein elektrisch leitendes Material verwendet werden. Hierfür kommen insbesondere Metalle, z.B. Gold, Halbleiter wie Silizium, leitfähige Polymere oder andere Materialien wie z.B. Graphit in Betracht.



Durch die eingestellte Nettoladung des festen Trägers kann die Orientierung der adsorbierten S-Schicht-Subeinheiten gesteuert werden. In einem ersten Fall wird die Oberfläche (5 mm^2) des festen Trägers so konditioniert, dass sie eine negative Nettoladung aufweist. Unter diesen Bedingungen binden die S-Schicht-Subeinheiten als Monoschicht mit der Innenseite, die den N-Terminus umfasst und bei einem pH-Wert von 6.5 positiv geladen ist. In einem zweiten Fall wird die Oberfläche des festen Trägers so konditioniert, dass sie eine positive Nettoladung aufweist, wobei die S-Schicht-Subeinheiten mit der bei einem pH-Wert von 6.5 negativ geladenen Außenseite binden.

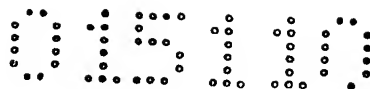
Nach Adsorption der S-Schicht-Subeinheiten wurde die S-Schicht-Proteinlösung entfernt und mehrmals mit A. purif. gewaschen. Um die Ausbildung des Kristallgitters zu induzieren, wurde eine Lösung von zweiwertigen Kationen (z. B. 5 mM CaCl_2) in Aq. purif. zugesetzt, und 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Da der N-terminale Teil (pI 8.94) nicht in den Self-Assembly Prozess involviert ist, ist vor allem die Neutralisation der negativen Ladungen im Bereich der Aminosäuren 208–920 durch die Zugabe von zweiwertigen Kationen wesentlich. Der Nachweis einer kristallinen S-Schicht-Struktur auf der Substratoberfläche wurde im AFM-Scannermikroskop ('Atomic Force Microscope') durchgeführt. Es konnten einkristalline Bereiche mit einer Größe von etwa $1\text{--}10 \mu\text{m}$ nachgewiesen werden, die allerdings unterschiedliche Orientierung zueinander zeigten.

Wird dagegen für die Adsorption das Potential in den dritten Bereich der Oxidbildung verschoben, kann die völlig veränderte Substratoberfläche nunmehr andere vertikale chemische Bindungen (z.B. nicht elektrostatische Wechselwirkungen) zur bereits ausgebildeten kristallisierten S-Schicht eingehen.

Beispiel 2

In diesen Versuchen wurde ein rekombinant hergestelltes rSbsB-Streptavidin-Fusionsprotein verwendet. Die funktionelle Domäne (Streptavidin) ist am C-terminalen Ende des S-Schicht-Proteins fusioniert. Der pI der Sequenz, die zwischen Aminosäure 208–920 von SbsB liegt sowie das heterotetramere Streptavidin umfasst, beträgt 5.60. Das C-terminale SbsB-Streptavidin-Fusionsprotein ist wasserlöslich, und bildet das schräge S-Schicht-Gitter nur an vorkonditionierten Oberflächen aus (z.B. Zellwandsacculi von *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2, die Peptidoglykan vom A1 γ -Chemotyp und das für den Organismus typische sekundäre Zellwandpolymer enthalten).

Für die Rekristallisation wurde eine Lösung, die $200 \mu\text{g}$ des Fusionsproteins in $500 \mu\text{l}$ Aq. purif. enthielt, mit einer 5 mm^2 großen negativ geladenen festen Oberfläche in Kontakt



gebracht. Die Bindung des Fusionsproteins erfolgte hier über die bei einem pH-Wert von 6.0 positiv geladene N-terminale Region. Zur Stabilisierung des S-Schicht-Gitters wurden 500 µl einer Lösung, die 1-Ethyl-3,3'-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid (EDC) als Zero-Length-Crosslinker enthielt (1 mg EDC je ml Aq. purif., wobei der pH-Wert der Lösung mit 0.01 M HCl auf 4.75 eingestellt wurde), zugegeben und 60 Minuten bei 20°C inkubiert. EDC kann nur an jenen Stellen vernetzen, wo Amino- und Carboxylgruppen in direkter elektrostatischer Wechselwirkung vorliegen, wie etwa im Falle von benachbarten S-Schicht-Subeinheiten. Nach der Inkubation wurde der Träger einige Male mit Aq. purif. gewaschen. Anschließend wurde die Struktur des S-Schicht-Gitters im AFM-Mikroskop untersucht. Das schräge S-Schicht-Gitter war deutlich zu sehen. Die unterschiedlich orientierten Bereiche hatten eine Größe von etwa 1 -10 µm.

Beispiel 3

Das reife S-Schicht-Protein SbpA (Aminosäuren 31-1268; pI 4.60; vgl. Tabelle 1) kristallisiert in einem quadratischen Gitter. Der N-terminale Teil (Aminosäuren 31-202) des reifen S-Schicht-Proteins umfasst die 3 SLH-Motive und die Bindungsregion für das sekundäre Zellwandpolymer, und weist einen pI von 4.49 auf. Der pI der restlichen Sequenz (Aminosäuren 203-1268) liegt bei 4.63. Der N-terminale Teil ist in den Self-Assembly Vorgang nicht involviert.

Für die Ausbildung von Self-Assembly Produkten mit quadratischem Gitter sind zweiwertige Kationen erforderlich. Eine Lösung, die 200 µg rSbpA je ml Aq. purif. enthielt und einen pH-Wert von 6.0 aufwies, wurde auf eine 5 mm² große positiv geladene Trägeroberfläche gebracht, und 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige S-Schicht-Protein-Lösung gewegewaschen. Zur Ausbildung des Kristallgitters wurde eine 10 mM CaCl₂-Lösung auf die Trägeroberfläche gebracht, und 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach Waschen mit Aq. purif. wurde der Träger im AFM untersucht. Es waren etwa 0.5 µm große Bereiche mit quadratischem Gitter zu erkennen, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Oberflächenstrukturen deutlich unterschieden; die beiden unterschiedlich strukturierten Bereiche lagen etwa im Verhältnis 1 : 1 vor. Daraus wurde geschlossen, dass die S-Schicht-Subeinheiten sowohl mit der Innenseite (raue Oberfläche), wie auch mit der Außenseite (glatte Oberfläche) adsorbieren konnten. Dieses Beispiel zeigt, dass eine einheitlich orientierte Abscheidung der S-Schicht-Subeinheiten auf ein geladenes Substrat nur dann erfolgt, wenn S-Schicht-Subeinheiten auf ihrer inneren und äußeren Oberfläche unterschiedlich geladene Domänen aufweisen (vgl. Beispiele 2 und 3).

Beispiel 4

Es sollte das rekombinant hergestellte Fusionsprotein rSbsC-Bet v 1 auf festen Oberflächen kristallisiert werden. In dem rSbsC-Bet v 1 ist am C-terminalen Ende einer verkürzten SbsC-Form, die Aminosäuren 31-920 umfasst und einen pI von 6.09 aufweist, die Sequenz des Haupt-Birkenpollen-Allergens Bet v 1 (161 Aminosäuren) über 2 Glycinreste als Linker fusioniert. Das reife SbsC (Aminosäuren 31-1099) weist einen pI von 5.40 auf. Der pI der N-terminalen Region (Aminosäuren 31-270) liegt bei 9.13; jener der restlichen Sequenz (Aminosäure 271-1099) beträgt 4.88 (siehe Tabelle 1). Der N-terminale Teil ist in den Self-Assembly Vorgang nicht involviert.

Zur Kristallisation an einer festen Oberfläche mit negativer Nettoladung wurde eine Lösung von 250 µg rSbsC-Bet v 1-Fusionsprotein je ml Aq. purif. mit einem pH-Wert von 6.0 aufgebracht. Auf diese Weise erfolgte die Adsorption des Fusionsproteins über den positiv geladenen N-Terminus. Die am C-terminalen Ende angehängte Bet v 1-Sequenz blieb demnach nach außen exponiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 20°C wurde durch Zugabe von 0.01 M HCl ein pH-Wert von 6.09 eingestellt, sodass die negative Nettoladung des C-terminalen S-Schicht-Protein-Anteiles verloren ging, und die Subeinheiten „komprimiert“ wurden, d.h. infolge des Verlustes der Nettoladung eine gegenseitige Annäherung erfolgte. Durch diesen Vorgang wurde die regelmäßige Gitterstruktur ausgebildet.

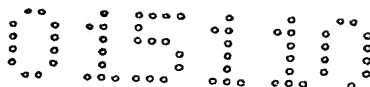
Beispiel 5

Dieses Beispiel illustriert die kontinuierliche Beschichtung eines Substrats in Form eines Bandmaterials mit S-Schichten.

Beispielsweise kann dies mit einer Vorrichtung V2 wie in Fig. 2 gezeigt erfolgen. Das zu beschichtende Band BB, z.B. bestehend aus einem Kunststoff-Trägermaterial, das auf jener Seite, auf der die S-Schicht abgelagert werden soll, metallbeschichtet ist, wird von einer Rolle BR abgespult und über geeignete Ablenkwalzen oder -rollen AR durch die Behälter B1, B2, B3, B4 geführt. Die Zahl der Bäder ist hier natürlich nur beispielsweise gegeben und kann dem gewünschten Prozess angepasst werden, und zwar erhöht oder verringert. Das leitfähige Bandmaterial wird nach bekannter Art über Schleifkontakte S1, S2 aufgeladen bzw. nach der Bäderfolge wieder entladen (Erdung).

In dem hier betrachteten Beispiel sind die einzelnen Behälter wie folgt gefüllt:

Behälter B1: Aq. purif. zum Waschen und Reinigen der Folie;



- Behälter B2: Lösung mit S-Schicht-Protein (rSbsC; 50 µg/ml in Aq. purif. bei pH 5.7) zur Beladung der Folie mit S-Schicht-Protein;
- Behälter B3: Lösung (20 mM CaCl₂-Lösung in Aq. purif.) zur Kristallisation des adsorbierten S-Schicht-Proteins;
- Behälter B4: Vernetzerlösung (0.5% Glutaraldehyd in 0.2 M Na-Cacodylat-Puffer, pH 7.0), in der die chemische Vernetzung der kristallinen Schicht zur weiteren Stabilisierung erfolgt.

Die Verweil- bzw. Durchlaufdauer des Bandes in jeweils einem Behälter liegt zwischen 20 und 120 Minuten. Nach der Beschichtung und chemischen Vernetzung können noch weitere (nicht gezeigte) Schritte, wie ein Waschschriff und ein Trocknungsschritt durchgeführt werden.

Selbstverständlich kann anstelle der Bäderfolge B1-B4 auch eine andere Bäderfolge verwendet werden, z.B. einem der Beispiele 1 bis 4 entsprechend.

In einer Variante zu diesem Beispiel kann auch eine nicht-leitendes Material, wie z.B. eine Polymerfolie, beschichtet werden. In diesem Fall erfolgt die Aufladung des Bandmaterials nicht über Schleifkontakte wie in Fig. 2, sondern elektrostatisch. Bezugnehmend auf Fig. 3 wird hierzu die Folie BB' in direktem Kontakt oder in geringem Abstand an einer geladenen Walze oder Stab R1 vorbeigeführt und auf diese Weise elektrostatisch aufgeladen. Hierzu wird der Stab R1 zweckmäßigerweise auf eine Hochspannung von beispielsweise 1000 V gelegt. Dieser Stab R1 würde in der Vorrichtung V2 der Fig. 2 anstelle des Schleifkontakts S1 montiert werden.

Beispiel 6

Dieses Beispiel behandelt die Kristallisation eines S-Schicht-Proteins durch ein elektrophoretisches Verfahren, beispielsweise in einer elektrochemischen Suspensionszelle nach B. Kastening *et al.*, in J. Electroanal. Chem. 265 (1989), S. 77-101. In der von Kastening beschriebenen elektrochemischen Suspensionszelle, die in Fig. 4 schematisch gezeigt ist, ist auf der rechten Seite in einem ersten Behälter CC, der als „Fütterkammer“ dient, ein rotierender Teil FD aus Graphit von konischer Gestalt und strukturierter Oberfläche vorhanden. Der rotierende Teil FD wird mit Hilfe eines Potentiostaten PS auf einem konstanten Arbeitspotential U_w gegenüber dem Potential U_0 einer Gegenelektrode XC gehalten. Er dient weiters als „Fütterelektrode“, die den in der Folge in die Zelle eingebrachten Partikeln ein bestimmtes Potential verleihen soll.

Die Diagramme der Fig. 5 veranschaulichen den Vorgang der S-Schicht-Kristallisation auf den Partikeln. An der Oberfläche FS der Fütterelektrode FD wird elektrische Ladung auf die in Suspension befindlichen Partikel NP übertragen, die in dem Behälter CC an der Fütterelektrode FD vorbeigeführt werden – Fig. 5a. In dem hier betrachteten Beispiel übernehmen die so elektrophoretisch behandelten Partikel CP eine negative Ladung von der Fütterelektrode. Im nächsten Schritt – Fig. 5b – lagern sich die S-Schicht-Einheiten SU in einer Orientierung auf das Partikel CP' ab, wobei die Orientierung durch die Verteilung der geladenen Domänen und die auf der Partikeloberfläche befindliche Ladung bestimmt ist. Dies erfolgt im hier betrachteten Beispiel über den N-Terminus von rSbsB, der eine positive Nettoladung aufweist und in Fig. 5 als schraffierte Spitze der S-Schicht-Subeinheiten dargestellt ist. Auf der Oberfläche kann auch schon die Formierung von Oligomeren SM stattfinden. Durch weitere Adsorption wird eine vollständige Bedeckung der Partikel erreicht. Durch Kristallisation der S-Schicht erhält man ein von einer zusammenhängenden S-Schicht SL überzogenes Partikel EP. Als Kern KP' für diese Partikel können verschiedene disperse Materialien wie z.B. Metallpartikel aus Au, Pt oder anderen Metallen, Kohlenstoff in Form von Graphitpartikel oder Aktivkohle, Kunststoff-beschichtete Partikel oder magnetische Partikel verwendet werden.

Für die Aufladung der Partikel wird in der Apparatur der Fig. 4 die Lösung mittels einer Pumpe Pm in dem Hauptkreislauf K1 an der Fütterelektrode FD vorbeigeführt. Der Behälter CC weist auch eine Referenzelektrode RD zum stromfreien Messen des Potentials U_r der Lösung auf. Außerdem ist ein Nebenschleife K2 vorgesehen, der über eine Messkammer MC führt, in der über eine Messelektrode MD die Ladung der in der Lösung suspendierten Partikel gemessen werden kann; hierzu wird beispielsweise mittels einer Konstantspannungsquelle CV eine Spannung zwischen der Messelektrode MD und einer auf dem Arbeitspotential U_w liegenden Zylinderelektrode CD aufgebaut, und aus dem Strom (als Spannung U_m gemessen) kann nach bekannter Art die Ladung der Partikel bestimmt werden. Die Messkammer MK kann auch zum Zu- oder Abführen der verwendeten Lösungen und Zusatzstoffe über die Einlass- und Auslassventile IV,OV verwendet werden.

In die elektrochemische Suspensionszelle werden 25 ml einer Suspension aus 5 g Polystyrol-Latex-Kugeln mit einem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$ in einer Pufferlösung (0.1 M Na-Citrat-Lösung, pH 6.0) eingefüllt. Anstelle der Polystyrol-Latex-Kugeln können auch Polystyrol-Kugeln ohne Latexmantel verwendet werden; beide verwendeten Kugelmateriale sind Produkte der Banks Lab., in Indiana (USA). Das Potential der Fütterelektrode wird so eingestellt, dass die Kugeln eine negative Oberflächenladung annehmen, z.B. auf $-1\ \text{V}$ gegenüber der gesättigten Quecksilbersulfat-Elektrode XC. Nach einer Pumpzeit von 20 Minuten werden 25 ml einer S-Schicht-Proteinlösung (rSbsB; 0.25 mg je ml Aq. purif., pH-

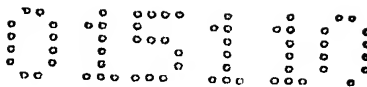
Wert 6.0) eingespritzt, z.B. in den Behälter MC oder über den Nebenkreis K2. Zur gerichteten Adsorption des S-Schicht-Proteins über den an der Innenseite liegenden und bei einem pH-Wert von 6.0 positiv geladenen N-terminalen Teil wird die Suspension 2 Stunden bei 20°C zirkuliert. Dies geschieht zweckmäßigerweise bei Zirkulation im Nebenkreis K2, wobei der Kreis K1 durch ein (nicht gezeigtes) Ventil in der Zuführleitung des Behälters CC geschlossen wird; dadurch wird eine Abscheidung von S-Schicht-Protein auf die Fütterelektrode vermieden. Anschließend wird die Suspension der Zelle entnommen, 20 Minuten bei 40.000 g bei 20°C zentrifugiert, der klare Überstand verworfen, und das verbleibende Zentrifugat – das sogenannte Pellet – in 20 ml einer 10 mM CaCl₂-Lösung suspendiert. Die Suspension wird in der Folge 4 h bei 20°C leicht gerührt. In Gegenwart von zweiwertigen Kationen lagert sich das zunächst adsorbierte S-Schicht-Protein in ein zusammenhängendes kristallines S-Schicht-Gitter um. Die Suspension wird in der Folge neuerlich zentrifugiert, und einmal mit 20 ml einer 10 mM CaCl₂-Lösung gewaschen. In dem so hergestellte Pellet stehen die auf der S-Schicht immobilisierten Funktionen (z.B. Rezeptoren wie Antikörper) in Form einer Suspension in hoher Konzentration zur Verfügung.

Für die Untersuchung im Mikroskop wurden 1 – 2 µl des Pellets in Freon 22 (mit flüssigem Stickstoff gekühlt) eingefroren, und einer Gefrierätzung unterzogen. Zur Untersuchung der Ausbildung des kristallinen Gitters wurde das Präparat im Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. Es konnte eine vollständige Beschichtung der Partikel mit S-Schicht-Protein, das in ein schräges Gitter assemblierte, festgestellt werden.

Wien, den **29. Mai 2001**

Die Anmelderin
durch:

PATENTANWALT
DIPL.-ING. FRANZ MATSCHNIG
A-1071 Wien, Siebensterngasse 54
Tel. 523 34 96 Fax 526 48 86



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Erzeugen einer Schicht funktioneller Moleküle auf einer Trägeroberfläche unter Verwendung von Zelloberflächenschicht-Proteinen (S-Schicht-Proteinen) als Träger der funktionellen Moleküle, bei welchem eine S-Schicht-Proteine in Form von Monomeren oder Oligomeren enthaltende Lösung mit der Trägeroberfläche in Kontakt gebracht wird, eine Lage von S-Schicht-Proteinen auf der Trägeroberfläche abgeschieden wird und in der so gebildeten Lage eine zweidimensionale kristalline Struktur ausgebildet wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

zum Abscheiden der S-Schicht-Proteine elektrochemische Bedingungen in der Lösung eingestellt werden, bei welchen die S-Schicht-Proteine eine elektrische Nettoladung aufweisen, und durch Einstellung des elektrischen Potentials des Substrats eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen der Lösung und der Trägeroberfläche hergestellt wird, unter deren Wirkung sich die S-Schicht-Proteine aus der Lösung auf die Trägeroberfläche anreichern.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Abscheiden der S-Schicht-Proteine und das Ausbilden der kristallinen Struktur voneinander zeitlich getrennt und unter verschiedenen elektrochemischen Bedingungen der Lösung und/oder des Substrats erfolgen.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Änderung der elektrochemischen Bedingungen zwischen Abscheiden und Kristallisation das elektrochemische Potential der Trägeroberfläche gegenüber der Lösung geändert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Änderung der elektrochemischen Bedingungen zwischen Abscheiden und Kristallisation zumindest ein chemischer Parameter der Lösung variiert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Änderung der elektrochemischen Bedingungen zwischen Abscheiden und Kristallisation zumindest ein elektrochemischer Parameter des Substrats variiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die elektrische Nettoladung der S-Schicht-Proteine durch Einstellen des pH-Werts der Lösung bestimmt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die elektrische Nettoladung der S-Schicht-Proteine diesen elektrostatisch oder elektrophoretisch aufgeprägt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass bei dem Abscheiden der S-Schicht-Proteine und/oder dem Ausbilden der kristallinen Struktur eine Konformationsänderung der Proteine eintritt, insbesondere eine Denaturierung bzw. Renaturierung.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Abscheiden der S-Schicht-Proteine und/oder das Ausbilden der kristallinen Struktur durch einen zeitlich variierten Potential/Stromverlauf gesteuert wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Abscheiden der S-Schicht-Proteine auf das Substrat in einer ersten Lösung und das Ausbilden der kristallinen Struktur in einer zweiten Lösung durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass dem Substrat vor dem Eintauchen in die erste Lösung eine Nettoladung elektrostatisch oder elektrophoretisch aufgeprägt wird, welche bei dem Durchgang durch die Lösungen erhalten bleibt.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass dem Substrat in der ersten Lösung elektrochemisch eine Nettoladung aufgeprägt wird, welche bei dem Wechsel der Lösungen erhalten bleibt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Wechsel der Lösungen durch Transport der Trägeroberfläche von einem ersten Lösungsbad (für das Abscheiden) zu einem zweiten (für die Kristallisation) geschieht.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass funktionelle Moleküle an S-Schicht-Proteine noch vor der Abscheidung der S-Schicht-Proteine gebunden werden und sodann die funktionellen Moleküle auf das Substrat zugleich mit dem Abscheiden der S-Schicht-Proteine abgelagert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Moleküle auf einer Seite der S-Schicht-Proteine gebunden werden und für das Abscheiden elektrochemische Bedingungen gewählt werden, unter denen die S-Schicht-Proteine ein resultierendes Dipolmoment aufweisen, wobei aufgrund der Ausrichtung des Dipolmoments nahe der Trägeroberfläche im infolge der Potentialdifferenz bestehenden elektrischen Feld besagte Seite der S-Schicht-Proteine von der Trägeroberfläche abgewandt ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Ausbildung der kristallinen Struktur in der S-Schicht-Lage funktionelle Moleküle auf das Substrat an durch die kristalline Struktur definierte Positionen abgelagert werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Ausbildung der kristallinen Struktur in der S-Schicht-Lage elektrochemisch Nanopartikel auf das Substrat an durch die kristalline Struktur definierte Positionen abgelagert werden.

Wien, den **29. Mai 2001**

Die Anmelderin
durch:

PATENTANWALT
DIPL.-ING. FRANZ MATSCHNIG
A-1071 Wien, Siebensterngasse 54
Tel. 523 34 96 Fax 526 48 86

ZUSAMMENFASSUNG

Auf einer Trägeroberfläche (CP) wird eine Lage von Zelloberflächenschicht-Proteinen (S-Schicht-Proteinen) (SU,SM,SL) als Träger funktioneller Moleküle dadurch erzeugt, dass eine S-Schicht-Proteine in Form von Monomeren (SU) oder Oligomeren (SM) enthaltende Lösung mit der Trägeroberfläche in Kontakt gebracht wird. Zum Abscheiden der S-Schicht-Proteine werden elektrochemische Bedingungen in der Lösung eingestellt, bei welchen die S-Schicht-Proteine (SU) eine elektrische Nettoladung aufweisen, und durch Einstellung des elektrischen Potentials der Trägeroberfläche (CP) wird eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen der Lösung und der Trägeroberfläche hergestellt, unter deren Wirkung sich die S-Schicht-Proteine aus der Lösung auf die Trägeroberfläche anreichern. In der so gebildeten Lage wird dann eine zweidimensionale kristalline Struktur (SL) ausgebildet, wobei dies vom Abscheiden der S-Schicht-Proteine zeitlich getrennt und unter verschiedenen elektrochemischen Bedingungen der Lösung und/oder des Substrats erfolgen kann.

Fig. 5

1/3

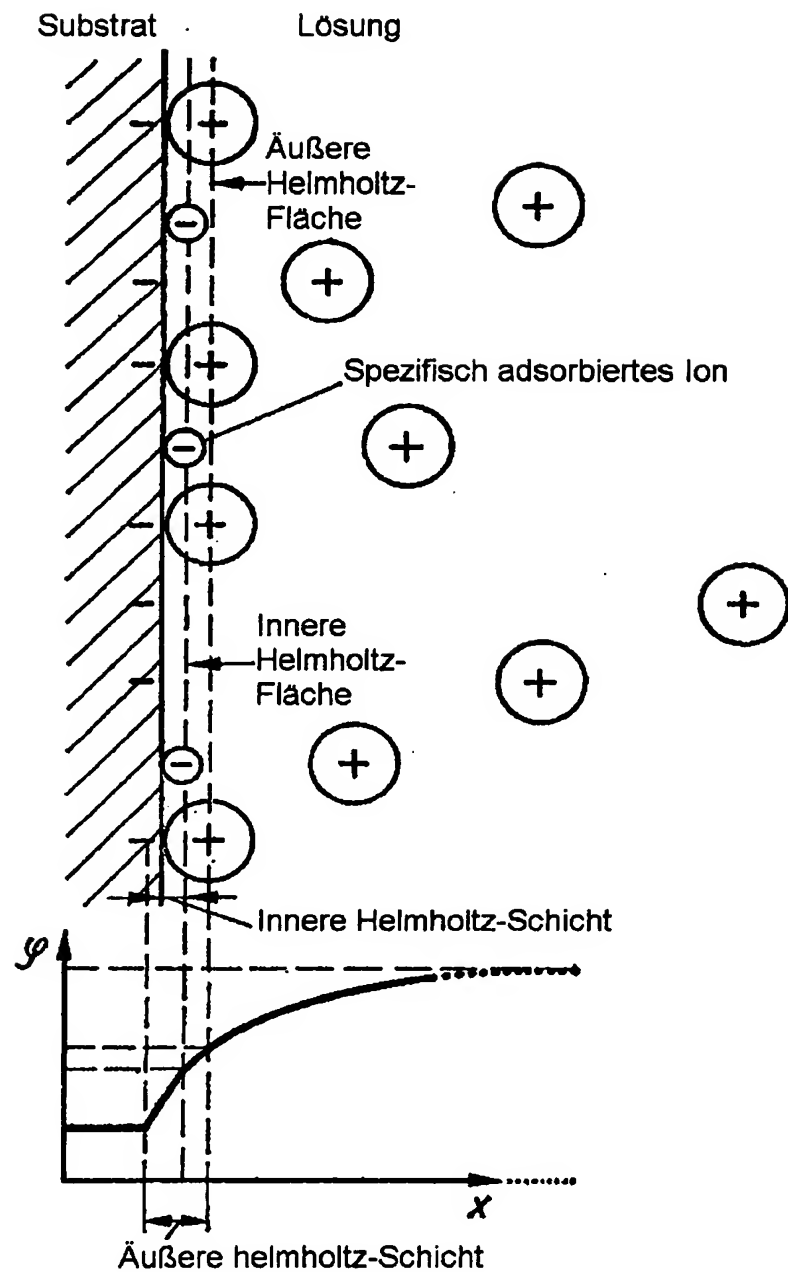
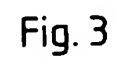
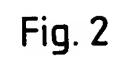


Fig. 1



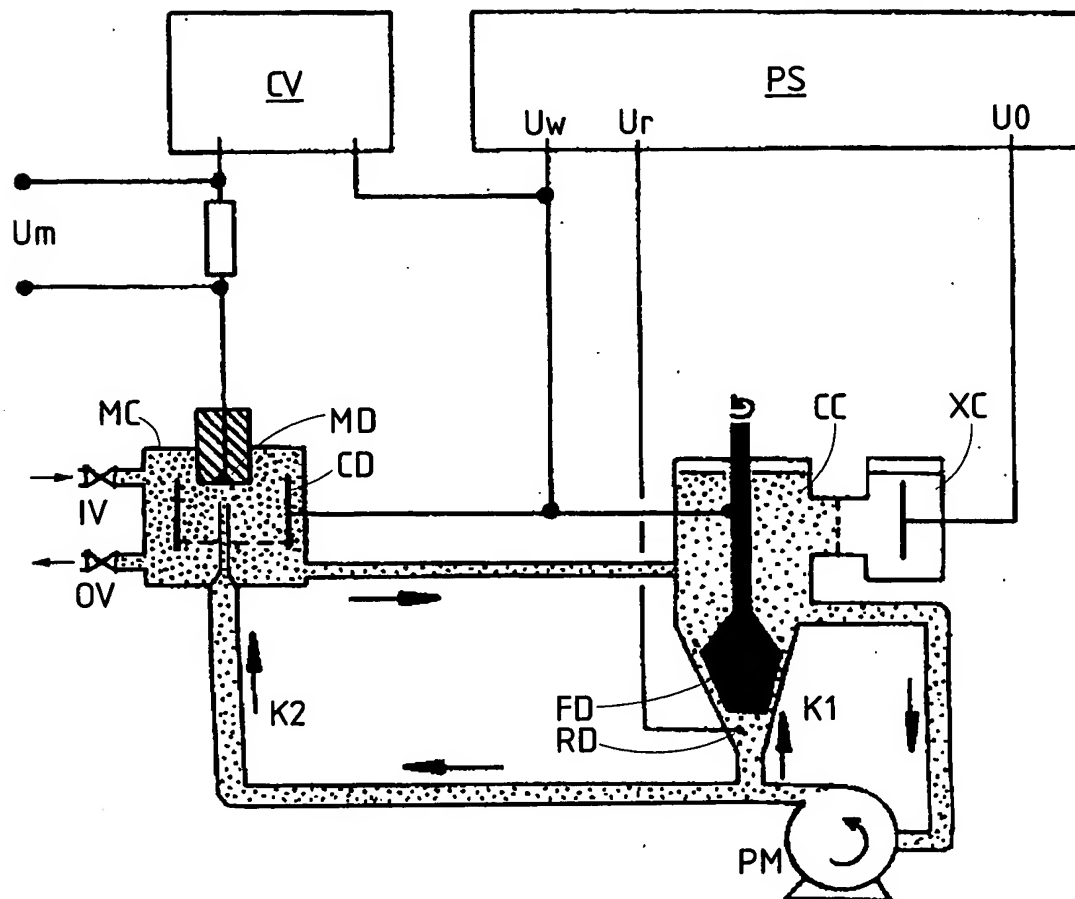


Fig. 4

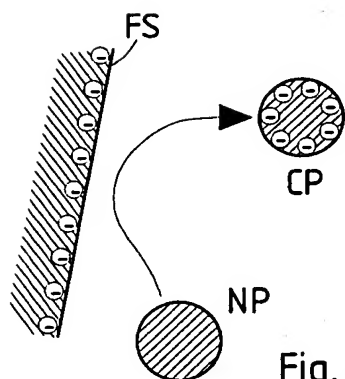


Fig. 5a

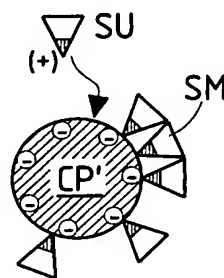


Fig. 5b

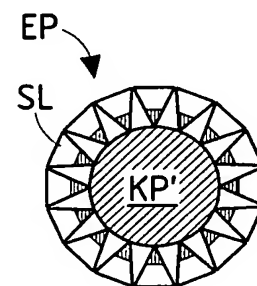


Fig. 5c

Fig. 5